

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 35 219 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 198 35 219.0
⑳ Anmeldetag: 5. 8. 1998
㉑ Offenlegungstag: 10. 2. 2000

㉒ Int. Cl. 7:
C 12 N 15/82
C 12 N 15/60
C 12 N 9/88
C 07 H 21/04
A 01 H 5/00
// C 12Q 1/68, 1/527

DE 198 35 219 A 1

㉓ Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

㉔ Erfinder:
Reindl, Andreas, Dr., 67134 Birkenheide, DE; Leon
Mejia, Patricia, Prof. Dr., Cuernavaca Morelos, ZZ;
Esteves Palmas, Juan Manuel, Loma Bonita
Tecamac Estado, ZZ; Cantero Gracia, Maria Araceli,
Loma Bonita Cuernavaca Mar., ZZ; Ebneith, Marcus,
06484 Quedlinburg, DE; Herbers, Karin, Dr., 06484
Quedlinburg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

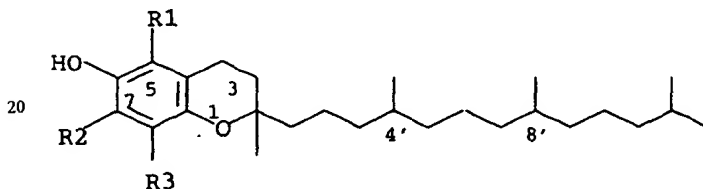
- ㉕ DNA-Sequenz codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und deren Überproduktion in Pflanzen
- ㉖ Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E Biosyntheseleistung durch Überexpression eines pflanzlichen 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase-Gens aus Arabidopsis.

DE 198 35 219 A 1

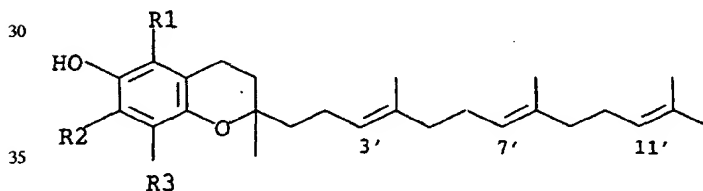
Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, speziell die Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz, einem Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, die derart hergestellte Pflanze selbst, sowie die Verwendung der SEQ ID No. 1 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bisher die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z. B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a-d):



- 1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 1b, β -Tocopherol [148-03-8]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$
 1c, γ -Tocopherol [54-28-4]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 1d, δ -Tocopherol [119-13-1]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$



- 2a, α -Tocotrienol [1721-51-3]: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 2b, β -Tocotrienol [490-23-3]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$
 2c, γ -Tocotrienol [14101-61-2]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 2d, δ -Tocotrienol [25612-59-3]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt α -Tocopherol.

Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Tocopherol-Gehalt bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch wäre die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, ein für die Tocopherol Syntheseleistung kodierendes, essentielles Biosynthesegen zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus C_5 Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z. B. Carotinoide) bestehen aus C-Skeletten, die ausschließlich auf Isopren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z. B. Chlorophyll) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit einem aromatischen Kern verbunden ist.

Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind $3 \times \text{Acetyl-CoA}$ Einheiten, die über β -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit (C_5), dem Isopentenylpyrophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch in vivo Fütterungsexperimente mit C^{13} gezeigt, daß in verschiedenen Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschriftet wird:

Glycerinaldehyd-3-Phosphat + Pyruvat

DOXS

1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat

DMAPP \rightleftharpoons IPP

GPP

IPP

2 IPP

GGPP \longrightarrow Carotinoide

PPP

Tocopherole

Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase vermittelten "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-phosphat umgewandelt (Schwender et al., FEBS Lett. 414 (1), 129-134 (1997); Arigoni et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 94 (2), 10600-10605 (1997); Lange et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95 (5), 2100-2104 (1998); Lichtenthaler et al., FEBS Lett. 400 (3), 271-274 (1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung in IPP umgesetzt (Arigoni et al., 1997). Biochemische Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytosol, während die Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflusst ist (Bach und Lichtenthaler, Physiol. Plant 59 (1983), 50-60. Der Mevalonatunabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyllipiden (Schwender et al., 1997; Arigoni et al. 1997).

IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C₁₀) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum Sesquiterpen (C₁₅) Farnesyl-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen (C₂₀) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C₄₀-Vorläufer für Carotinoide. GGPP wird durch eine Prenylketten-Hydrogenase zum Phytanyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone, deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinäure überführt wird. Diese wird an PPP gebunden, um den Vorläufer von α -Tocopherol und α -Tocoquinon, das 2-Methyl-6-phytylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung γ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung α -Tocopherol (Richter, Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).

In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß direktional beeinflussen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotinoid-Mengen dieser transgenen

Tomatenpflanzen gemessen werden (Fray und Grierson, *Plant Mol.Biol.* 22 (4), 589–602 (1993); Fray et al., *Plant J.*, 8, 693–701 (1995). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenylalanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91 (16): 7608–7612 (1994); Howles et al., *Plant Physiol.* 112, 1617–1624 (1996).

Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

- 10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden.

Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) -Gens in den Pflanzen.

- 15 Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in Pflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression des homologen Gens (Gen aus Organismus der selben Art) erhöht. Dies kann auch durch die Expression eines heterologen Gens (Gen aus entfernten Organismen) erreicht werden. Nukleotidsequenzen sind aus *Arabidopsis thaliana* DOXS (Acc. No. U 27099), Reis (Acc. No. AF024512) und Pfefferminze (Acc. No. AF019383) beschrieben.

- 20 In einem Ausführungsbeispiel wird das DOXS-Gen aus *Arabidopsis thaliana* (Seq-ID No.: 1; Mandel et al. *Plant J.* 9, 649–658 (1996); Acc. No. U27099) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Eine Plastidenlokalisierung ist durch die in der Gensequenz enthaltenen Transitsignalsequenz gewährleistet. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DOXS-Gen codiert, das mit Seq-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. vorzugsweise aus anderen Pflanzen stammt.

- 25 Das nun vermehrt zur Verfügung stehende GGPP wird weiter in Richtung Tocopherole und Carotinoide umgesetzt.

- Die effiziente Bildung von Carotinoiden ist essentiell für die Photosynthese, wobei sie neben den Chlorophyllen als "Lichtsammler-Komplexe" zur besseren Ausnutzung der Photonenenergie dienen (Heldt, *Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford*, 1996). Zusätzlich erfüllen Carotinoide wichtige Schutzfunktionen gegen Sauerstoff-Radikale wie den Singulett-Sauerstoff, den sie wieder in den Grundzustand zurückführen können (Asada, 1994; Demming-Adams und Adams, *Trends in Plant Sciences* 1; 21–26 (1996). Es wurde eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase defekte *Arabidopsis thaliana* Mutante isoliert, die einen "Albino-Phänotyp" zeigt (Mandel et al. 1996). Daraus ist abzuleiten, daß eine verringerte Menge an Carotinoiden in den Plastiden negative Auswirkungen auf die Pflanze hat.

- 35 Zusätzliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Expression eines DOXS-Gens aus *Arabidopsis* bzw. damit hybridisierenden DNA-Sequenzen und anschließende Testung von Chemikalien auf Hemmung der DOXS-Enzymaktivität.

- Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden *Arabidopsis* und Raps eingesetzt.

- 40 Die Klonierung des vollständigen DOXS-Gens aus *Arabidopsis* erfolgt über die Isolierung der für das DOXS-Gen spezifischen cDNA (Seq-ID No.: 1).

- Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenz SEQ ID No. 1, die für eine DOXS oder deren funktionelles Äquivalent kodiert, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z. B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

- Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d. h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d. h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaic-Virus (Gallie et al., *Nucl. Acids Res.* 15 (1987) 8693–8711).

- 60 Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 1 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- 65
- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
 - OCS: Octopin-Synthase-Terminator
 - PNOS: Nopal-Synthase-Promotor
 - außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285–294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195–2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z. B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361–366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetracyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397–404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u. a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet.

Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445–245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67% des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090–1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al. Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459–467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten. Der Aufbau einer derartigen Kassette ist in der Abb. 1 schematisch beispielhaft dargestellt.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E. F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T. J. Silhavy, M. L. Berman und L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285–423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781–792).

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Besonders bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS-Gens in die Chloroplasten vom DOXS-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z. B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DOXS kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DOXS-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptern oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DOXS-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z. B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z. B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u. a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al. Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781–792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten

pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Oc-topin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äqui-valente.

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transfor-mierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflan-zen, wie z. B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflan-zen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Trans-genic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines DOXS-Gens enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DOXS kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonie-rungsvektoren sind u. a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vekto-ren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend eine DNA-Se-quenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -ge-weben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chloro-phyll und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, fila-mentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Produktion eingesetzt werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzel-len zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mi-kroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225 beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefa-ciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere der stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mi-kroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225 beschrieben.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DOXS-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichen-der Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z. B. durch chemische Synthese erhal-tene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepasste, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ur-sprünglich isolierten für eine DOXS kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DOXS-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z. B. die weitere Eingren-zung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z. B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstel-len sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangs-gen bzw. Gen-fragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des DOXS-Gens in Kultur-pflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Mole-

cular Modelling konstruierter Proteine, die DOXS Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzen-genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches DOXS-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil, davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z. B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf DOXS-Expression möglich ist (z. B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z. B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das DOXS-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfindungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte sowie Fusionsproteine aus einem Transitpeptid und einem Polypeptid mit DOXS-Aktivität.

Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DOXS-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Der Biosyntheseort von Tocopherol ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des DOXS-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze – beispielsweise in fetthaltigen Samen – gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen DOXS-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression von Tocopherol wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DOXS-Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DOXS-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z. B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Um effiziente Hemmstoffe der DOXS finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz der DOXS aus Arabidopsis in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in E. coli überexprimiert.

Das mit Hilfe der Expressionskassette exprimierte DOXS-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die DOXS spezifischen Hemmstoffen.

Dazu kann die DOXS beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der DOXS in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen. Methoden zur Aktivitätsbestimmung der DOXS sind beschrieben (Putra et. al., Tetrahedron Letters 39 (1998), 23–26; Sprenger et al., PNAS 94 (1997), 12857–12862).

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf hemmende Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz Seq ID NO: 1 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- Verwendung einer Pflanze zur Herstellung pflanzlicher DOXS.
- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS durch verstärkte Expression einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA Sequenz.
- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS DNA-Sequenz in Pflanzen.
- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierenden DNA Sequenz zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z. B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kann) wurde von Deblaere et al. in (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777) beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103–119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZerO (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711–8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221–230) benutzt werden.

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463–5467).

Beispiel 1

Herstellung der *Arabidopsis thaliana* DOXS-Transformationskonstrukte

Das *Arabidopsis thaliana* DOXS Gen wurde wie in Mandel et al. (1996) beschrieben als vollständige cDNA in den Vektor pBluescript KS- (Stratagene) kloniert.

Zur Herstellung von Überexpressionskonstrukten wurde ein 2.3 kb Fragment (mit F-23-C bezeichnet) über die pBluescript KS- HincII und SacI Schnittstellen isoliert. Diese Sequenz enthält die vollständige DOXS-cDNA vom ATG-Startcodon bis zur EcoRI-Schnittstelle, die 80 bp stromabwärts des Stopcodons liegt. Dieses Fragment wurde über die Schnittstellen SmaI und SacI in den pBIN19 Vektor (Abb. 2) kloniert (Bevan et al., Nucl. Acid Res. 12, 8711 (1980), der den 35S Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (Franck et al., Cell 21 (1), 285–294 (1980) dreimal hintereinander angeordnet enthält.

Zur Herstellung von Antisense-Konstrukten wurde entweder die vollständige cDNA (mit F-23-C bezeichnet) oder ein 700 bp Fragment der 5'-Region in den oben erwähnten pBIN19-Vektor kloniert. Die vollständige DOXS-cDNA wurde über KpnI und SpeI aus dem Polylinker des pBluescript KS- isoliert und in die pBIN19-Polylinker-Schnittstellen XbaI und KpnI kloniert (Abb. 3). Zur Klonierung des 700 bp Fragments wurde die cDNA mit Hilfe der EcoRV Schnittstelle, die an Position 701 der cDNA liegt und der pBS KS-lokalisierten SmaI Schnittstelle verdaut. Das entstandene Fragment wurde in den Vektor pBS KS-subkloniert und erneut über die EcoRV und SmaI Schnittstellen in den oben beschriebenen pBIN19-Vektor in Antisense-Orientierung kloniert. Die Transformationen von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit den oben beschriebenen Konstrukten erfolgten mit *Agrobacterium tumefaciens* mit der Vakuum-Infiltrationsmethode (Bent et al., Science 265(1994), 1856–1860). Mehrere unabhängige Transformanten wurden pro Konstrukt isoliert. Jeder Buchstabe (siehe Tabelle 1) bedeutet eine unabhängige transformierte Linie. Aus der daraus erhaltenen T1-Generation wurden Pflanzen auf Homo- oder Heterozygotie untersucht. Mehrere Pflanzen jeder Linie wurden gekreuzt, um eine Segregationsanalyse durchzuführen. Die Nummer in der Tabelle 1 entspricht der individuellen Pflanze, welche für weitere Analysen ausgewählt wurde. Es wurden sowohl homo- als auch heterozygote Linien erhalten. Die Segregationsanalyse der erhaltenen Linien ist in der folgenden Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1

Segregationsanalyse der transgenen DOXS-T2-Pflanzen

LINIEN	SEGREGATION
A9	75%
A19	100%
B11	75%
B4	100%
C2	100%
D3	75%
D17	100%
E9	75%
E14	100%
F9	75%
F14	100%

Beispiel 2

Nachweis erhöhter DOXS-RNA-Mengen in transgenen Pflanzen

Gesamt RNA aus 15 Tage alten Keimlingen verschiedener transgener Linien, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, wurde nach der Methode von Logeman et al., Anal.Biochem. 163, 16-20 (1987) extrahiert, in einem 1.2% Agarosegel aufgetrennt, auf Filter transferiert und mit einem 2.1 kb langen DOXS-Fragment als Sonde hybridisiert (Abb. 4).

Beispiel 3

Nachweis erhöhter DOXS-Protein-Mengen in transgenen Pflanzen

Gesamtprotein (Abb. 5) aus 15 Tage alten Keimlingen verschiedener, unabhängiger transgener Pflanzen, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, wurde isoliert und mit einem polyklonalen Anti-DOXS-Antikörper (IgG) in einer Westernanalyse detektiert (Abb. 6).

Beispiel 4

Messung des Carotinoid- und Chlorophyllgehalts

Die Bestimmung der Gesamtcarotinoid- und Chlorophyllmengen wurde wie in Lichtenthaler und Wellburn (1983) beschrieben mit 100% Acetonextrakten durchgeführt. Die Ergebnisse der Mehrfachmessungen der transgenen Linien, welche das DOXS-Überexpressionskonstrukt besitzen, sind in der folgenden Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Gesamtcarotinoid- und Chlorophyllgehalt der transgenen DOXS-Linien

5	LINIE	% GESAMT CHLORO- PHYLL	% GESAMT CAROTINOIDE
	clal Mutante	5	5
	Wild Typ	100	100
10	B-4	86	89
	B-11	84	90
	C-2	98	107
15	D-3	128	135
	D-17	136	149
	E-14	121	139
20	F-7	80	90
	F-14	85	107

25

Beispiel 5

Transformation von Raps

30 Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen orientiert sich an einem Protokoll von Bade, JB und Damm, B (in Gene, Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30–38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien angegeben sind. Die Transformationen erfolgten mit dem Agrobacterium Stamm LBA4404 (Clontech). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen pBIN19-Konstrukte mit der gesamten DOXS-cDNA verwendet. In diesen pBIN-Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch die OCR-Terminatorsequenz ersetzt. Brassica napus Samen wurden mit 70% (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min in 55°C H₂O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Twenn 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H₂O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10–15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und 40 in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in LB mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml LB ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4–0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt.

45 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt. Zur Regeneration wurden jeweils 20–30 Explanten in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16/8 H inkubiert. Alle 12 Tage wurde die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J. B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30–38) beschrieben durchgeführt.

60

Beispiel 6

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

65 Die cDNA der DOXS wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert.

Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenese verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächs-

DE 198 35 219 A 1

haus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF AG
- (B) STRASSE: Carl-Bosch
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 67056
- (G) TELEPHON: 0621-60-52698

(ii) ANMELDETITEL: DOXS

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTR GER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) L NGE: 2458 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (B) STAMM: Arabidopsis thaliana

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: F-23-C

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..2154

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

- (A) AUTORS: Mandel, MA
Feldmann, KA
Herrera-Estrella, L
Rocha-Sosa, M
Leon, P

- (B) TITEL: CLA 1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution.

- (C) ZEITSCHRIFT: Plant Journal
- (D) BAND: 9
- (F) SEITEN: 649-658
- (G) DATUM: 1996

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG GCT TCT TCT GCA TTT GCT TTT CCT TCT TAC ATA ATA ACC AAA GGA
Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly
1 5 10 15

GGA CTT TCA ACT GAT TCT TGT AAA TCA ACT TCT TTG TCT TCT TCT AGA
Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Arg

DE 198 35 219 A 1

	TCT	TTG	GTT	ACA	GAT	CTT	CCA	TCA	CCA	TGT	CTG	AAA	CCC	AAC	AAC	AAT	144
	Ser	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Cys	Leu	Lys	Pro	Asn	Asn	Asn	
			35					40					45				
5	TCC	CAT	TCA	AAC	AGA	AGA	GCA	AAA	GTG	TGT	GCT	TCA	CTT	GCA	GAG	AAG	192
	Ser	His	Ser	Asn	Arg	Arg	Ala	Lys	Val	Cys	Ala	Ser	Leu	Ala	Glu	Lys	
			50				55					60					
10	GGT	GAA	TAT	TAT	TCA	AAC	AGA	CCA	CCA	ACT	CCA	TTA	CTT	GAC	ACT	ATT	240
	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Leu	Leu	Asp	Thr	Ile	
		65				70					75					80	
	AAC	TAC	CCA	ATC	CAC	ATG	AAA	AAT	CTT	TCT	GTC	AAG	GAA	CTG	AAA	CAA	288
	Asn	Tyr	Pro	Ile	His	Met	Lys	Asn	Leu	Ser	Val	Lys	Glu	Leu	Lys	Gln	
15					85					90					95		
	CTT	TCT	GAT	GAG	CTG	AGA	TCA	GAC	GTG	ATC	TTT	AAT	GTG	TCG	AAA	ACC	336
	Leu	Ser	Asp	Glu	Leu	Arg	Ser	Asp	Val	Ile	Phe	Asn	Val	Ser	Lys	Thr	
				100					105					110			
20	GGT	GGA	CAT	TTG	GGG	TCA	AGT	CTT	GGT	GTT	GTG	GAG	CTT	ACT	GTG	GCT	384
	Gly	Gly	His	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Gly	Val	Val	Glu	Leu	Thr	Val	Ala	
			115					120					125				
25	CTT	CAT	TAC	ATT	TTC	AAT	ACT	CCA	CAA	GAC	AAG	ATT	CTT	TGG	GAT	GTT	432
	Leu	His	Tyr	Ile	Phe	Asn	Thr	Pro	Gln	Asp	Lys	Ile	Leu	Trp	Asp	Val	
			130				135					140					
30	GGT	CAT	CAG	TCT	TAT	CCT	CAT	AAG	ATT	CTT	ACT	GGG	AGA	AGA	GGA	AAG	480
	Gly	His	Gln	Ser	Tyr	Pro	His	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Arg	Arg	Gly	Lys	
						150					155					160	
	ATG	CCT	ACA	ATG	AGG	CAA	ACC	AAT	GGT	CTC	TCT	GGT	TTC	ACC	AAA	CGA	528
	Met	Pro	Thr	Met	Arg	Gln	Thr	Asn	Gly	Leu	Ser	Gly	Phe	Thr	Lys	Arg	
					165					170					175		
35	GGA	GAG	AGT	GAA	CAT	GAT	TGC	TTT	GGT	ACT	GGA	CAC	AGC	TCA	ACC	ACA	576
	Gly	Glu	Ser	Glu	His	Asp	Cys	Phe	Gly	Thr	Gly	His	Ser	Ser	Thr	Thr	
				180					185					190			
40	ATA	TCT	GCT	GGT	TTA	GGA	ATG	GCG	GTA	GGA	AGG	GAT	TTG	AAG	GGG	AAG	624
	Ile	Ser	Ala	Gly	Leu	Gly	Met	Ala	Val	Gly	Arg	Asp	Leu	Lys	Gly	Lys	
				195				200					205				
45	AAC	AAC	AAT	GTG	GTT	GCT	GTG	ATT	GGT	GAT	GGT	GCG	ATG	ACG	GCA	GGA	672
	Asn	Asn	Asn	Val	Val	Ala	Val	Ile	Gly	Asp	Gly	Ala	Met	Thr	Ala	Gly	
				210			215					220					
	CAG	GCT	TAT	GAA	GCC	ATG	AAC	AAC	GCC	GGA	TAT	CTA	GAC	TCT	GAT	ATG	720
	Gln	Ala	Tyr	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Ala	Gly	Tyr	Leu	Asp	Ser	Asp	Met	
						230					235					240	
50	ATT	GTG	ATT	CTT	AAT	GAC	AAC	AAG	CAA	GTC	TCA	TTA	CCT	ACA	GCT	ACT	768
	Ile	Val	Ile	Leu	Asn	Asp	Asn	Lys	Gln	Val	Ser	Leu	Pro	Thr	Ala	Thr	
					245					250					255		
55	TTG	GAT	GGA	CCA	AGT	CCA	CCT	GTT	GGT	GCA	TTG	AGC	AGT	GCT	CTT	AGT	816
	Leu	Asp	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Val	Gly	Ala	Leu	Ser	Ser	Ala	Leu	Ser	
				260					265					270			
60	CGG	TTA	CAG	TCT	AAC	CCG	GCT	CTC	AGA	GAG	TTG	AGA	GAA	GTC	GCA	AAG	864
	Arg	Leu	Gln	Ser	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu	Arg	Glu	Val	Ala	Lys	
				275				280					285				
	GGT	ATG	ACA	AAG	CAA	ATA	GGC	GGA	CCA	ATG	CAT	CAG	TTG	GCG	GCT	AAG	912
	Gly	Met	Thr	Lys	Gln	Ile	Gly	Gly	Pro	Met	His	Gln	Leu	Ala	Ala	Lys	
				290			295					300					
65																	

DE 198 35 219 A 1

GTA GAT GTG TAT GCT CGA GGA ATG ATA AGC GGT ACT GGA TCG TCA CTG Val Asp Val Tyr Ala Arg Gly Met Ile Ser Gly Thr Gly Ser Ser Leu 305 310 315 320	960	
TTT GAA GAA CTC GGT CTT TAC TAT ATT GGT CCA GTT GAT GGG CAC AAC Phe Glu Glu Leu Gly Leu Tyr Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asn 325 330 335	1008	5
ATA GAT GAT TTG GTA GCC ATT CTT AAA GAA GTT AAG AGT ACC AGA ACC Ile Asp Asp Leu Val Ala Ile Leu Lys Glu Val Lys Ser Thr Arg Thr 340 345 350	1056	10
ACA GGA CCT GTA CTT ATT CAT GTG GTG ACG GAG AAA GGT CGT GGT TAT Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Glu Lys Gly Arg Gly Tyr 355 360 365	1104	15
CCT TAC GCG GAG AGA GCT GAT GAC AAA TAC CAT GGT GTT GTG AAA TTT Pro Tyr Ala Glu Arg Ala Asp Asp Lys Tyr His Gly Val Val Lys Phe 370 375 380	1152	
GAT CCA GCA ACG GGT AGA CAG TTC AAA ACT ACT AAT GAG ACT CAA TCT Asp Pro Ala Thr Gly Arg Gln Phe Lys Thr Thr Asn Glu Thr Gln Ser 385 390 395 400	1200	20
TAC ACA ACT TAC TTT GCG GAG GCA TTA GTC GCA GAA GCA GAG GTA GAC Tyr Thr Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Val Ala Glu Ala Glu Val Asp 405 410 415	1248	25
AAA GAT GTG GTT GCG ATT CAT GCA GCC ATG GGA GGT GGA ACC GGG TTA Lys Asp Val Val Ala Ile His Ala Ala Met Gly Gly Gly Thr Gly Leu 420 425 430	1296	30
AAT CTC TTT CAA CGT CGC TTC CCA ACA AGA TGT TTC GAT GTA GGA ATA Asn Leu Phe Gln Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile 435 440 445	1344	
GCG GAA CAA CAC GCA GTT ACT TTT GCT GCG GGT TTA GCC TGT GAA GGC Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly 450 455 460	1392	35
CTT AAA CCC TTC TGT GCA ATC TAT TCG TCT TTC ATG CAG CGT GCT TAT Leu Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr 465 470 475 480	1440	40
GAC CAG GTT GTC CAT GAT GTT GAT TTG CAA AAA TTA CCG GTG AGA TTT Asp Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe 485 490 495	1488	45
GCA ATG GAT AGA GCT GGA CTC GTT GGA GCT GAT GGT CCG ACA CAT TGT Ala Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys 500 505 510	1536	
GGA GCT TTC GAT GTG ACA TTT ATG GCT TGT CTT CCT AAC ATG ATA GTG Gly Ala Phe Asp Val Thr Phe Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Ile Val 515 520 525	1584	50
ATG GCT CCA TCA GAT GAA GCA GAT CTC TTT AAC ATG GTT GCA ACT GCT Met Ala Pro Ser Asp Glu Ala Asp Leu Phe Asn Met Val Ala Thr Ala 530 535 540	1632	55
GTT GCG ATT GAT GAT CGT CCT TCT TGT TTC CGT TAC CCT AGA GGT AAC Val Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn 545 550 555 560	1680	
GGT ATT GGA GTT GCA TTA CCT CCC GGA AAC AAA GGT GTT CCA ATT GAG Gly Ile Gly Val Ala Leu Pro Pro Gly Asn Lys Gly Val Pro Ile Glu 565 570 575	1728	60

65

DE 198 35 219 A 1

	ATT GGG AAA GGT AGA ATT TTA AAG GAA GGA GAG AGA GTT GCG TTG TTG	1776
	Ile Gly Lys Gly Arg Ile Leu Lys Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu	
	580 585 590	
5	GGT TAT GGC TCA GCA GTT CAG AGC TGT TTA GGA GCG GCT GTA ATG CTC	1824
	Gly Tyr Gly Ser Ala Val Gln Ser Cys Leu Gly Ala Ala Val Met Leu	
	595 600 605	
10	GAA GAA CGC GGA TTA AAC GTA ACT GTA GCG GAT GCA CGG TTT TGC AAG	1872
	Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys	
	610 615 620	
15	CCA TTG GAC CGT GCT CTC ATT CGC AGC TTA GCT AAG TCG CAC GAG GTT	1920
	Pro Leu Asp Arg Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val	
	625 630 635 640	
	CTG ATC ACG GTT GAA GAA GGT TCC ATT GGA GGT TTT GGC TCG CAC GTT	1968
	Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val	
	645 650 655	
20	GTT CAG TTT CTT GCT CTC GAT GGT CTT GAT GGC AAA CTC AAG TGG	2016
	Val Gln Phe Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp	
	660 665 670	
25	AGA CCA ATG GTA CTG CCT GAT CGA TAC ATT GAT CAC GGT GCA CCA GCT	2064
	Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala	
	675 680 685	
30	GAT CAA CTA GCT GAA GCT GGA CTC ATG CCA TCT CAC ATC GCA GCA ACC	2112
	Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr	
	690 695 700	
	GCA CTT AAC TTA ATC GGT GCA CCA AGG GAA GCT CTG TTT TGAGAGTAAG	2161
	Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe	
	705 710 715	
35	AATCTGTTGG CTAAACATA TGTATACAAA CACTCTAAAT GCAACCCAAG GTTCTTCTA	2221
	AGTACTGATC AGAATTCCCG CCCGAGAAGT CCTTTGGCAA CAGCTATATA TATTTACTAA	2281
	GATTGTGAAG AGAAAGGCAA AGGCAAAGGT TGTGCAAAGA TTAGTATTAT AGATAAACT	2341
40	GGTATTTGTT TTGTAATTTT AGGATTGTGA TGATATCGTG TTGTACCAAT AACTAACATC	2401
	TTGTAAATC AATTACTCTC TTGTGATCTT CAATAAGCTT GACTGACAAA AAAAAAA	2458
45	(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:	
	(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:	
	(A) L NGE: 717 Aminos,uren	
	(B) ART: Aminos,ure	
50	(D) TOPOLOGIE: linear	
	(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein	
	(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:	
55	Met Ala Ser Ser Ala Phe Ala Phe Pro Ser Tyr Ile Ile Thr Lys Gly	
	1 5 10 15	
	Gly Leu Ser Thr Asp Ser Cys Lys Ser Thr Ser Leu Ser Ser Ser Arg	
60	20 25 30	
	Ser Leu Val Thr Asp Leu Pro Ser Pro Cys Leu Lys Pro Asn Asn Asn	
	35 40 45	
65	Ser His Ser Asn Arg Arg Ala Lys Val Cys Ala Ser Leu Ala Glu Lys	
	50 55 60	

DE 198 35 219 A 1

Gly 65	Glu	Tyr	Tyr	Ser	Asn 70	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro 75	Leu	Leu	Asp	Thr	Ile 80	
Asn	Tyr	Pro	Ile	His 85	Met	Lys	Asn	Leu	Ser 90	Val	Lys	Glu	Leu	Lys 95	Gln	5
Leu	Ser	Asp	Glu 100	Leu	Arg	Ser	Asp	Val 105	Ile	Phe	Asn	Val	Ser	Lys 110	Thr	
Gly	Gly	His 115	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu 120	Gly	Val	Val	Glu	Leu 125	Thr	Val	Ala	10
Leu	His	Tyr	Ile	Phe	Asn	Thr 135	Pro	Gln	Asp	Lys	Ile 140	Leu	Trp	Asp	Val	
Gly 145	His	Gln	Ser	Tyr	Pro 150	His	Lys	Ile	Leu	Thr 155	Gly	Arg	Arg	Gly	Lys 160	15
Met	Pro	Thr	Met	Arg 165	Gln	Thr	Asn	Gly	Leu 170	Ser	Gly	Phe	Thr	Lys	Arg 175	20
Gly	Glu	Ser	Glu 180	His	Asp	Cys	Phe	Gly 185	Thr	Gly	His	Ser	Ser	Thr	Thr 190	
Ile	Ser	Ala 195	Gly	Leu	Gly	Met	Ala 200	Val	Gly	Arg	Asp	Leu 205	Lys	Gly	Lys	25
Asn	Asn	Asn	Val	Val	Ala	Val 215	Ile	Gly	Asp	Gly	Ala 220	Met	Thr	Ala	Gly	
Gln 225	Ala	Tyr	Glu	Ala	Met 230	Asn	Asn	Ala	Gly	Tyr 235	Leu	Asp	Ser	Asp	Met 240	30
Ile	Val	Ile	Leu	Asn 245	Asp	Asn	Lys	Gln	Val 250	Ser	Leu	Pro	Thr	Ala 255	Thr	
Leu	Asp	Gly	Pro 260	Ser	Pro	Pro	Val	Gly 265	Ala	Leu	Ser	Ser	Ala 270	Leu	Ser	35
Arg	Leu	Gln	Ser	Asn	Pro	Ala	Leu 280	Arg	Glu	Leu	Arg	Glu 285	Val	Ala	Lys	
Gly 290	Met	Thr	Lys	Gln	Ile	Gly 295	Gly	Pro	Met	His	Gln 300	Leu	Ala	Ala	Lys	40
Val 305	Asp	Val	Tyr	Ala	Arg 310	Gly	Met	Ile	Ser	Gly 315	Thr	Gly	Ser	Ser	Leu 320	45
Phe	Glu	Glu	Leu	Gly 325	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Gly 330	Pro	Val	Asp	Gly	His 335	Asn	
Ile	Asp	Asp	Leu 340	Val	Ala	Ile	Leu	Lys 345	Glu	Val	Lys	Ser	Thr	Arg	Thr	50
Thr	Gly	Pro	Val 355	Leu	Ile	His	Val 360	Val	Thr	Glu	Lys	Gly 365	Arg	Gly	Tyr	
Pro	Tyr	Ala	Glu	Arg	Ala	Asp 375	Asp	Lys	Tyr	His	Gly 380	Val	Val	Lys	Phe	55
Asp 385	Pro	Ala	Thr	Gly	Arg 390	Gln	Phe	Lys	Thr	Thr	Asn 395	Glu	Thr	Gln	Ser 400	
Tyr	Thr	Thr	Tyr	Phe 405	Ala	Glu	Ala	Leu	Val 410	Ala	Glu	Ala	Glu	Val	Asp 415	60
Lys	Asp	Val	Val	Ala	Ile	His	Ala	Ala 425	Met	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Leu 430	65

Asn Leu Phe Gln Arg Arg Phe Pro Thr Arg Cys Phe Asp Val Gly Ile
 435 440 445
 5 Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Cys Glu Gly
 450 455 460
 Leu Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Met Gln Arg Ala Tyr
 465 470 475 480
 10 Asp Gln Val Val His Asp Val Asp Leu Gln Lys Leu Pro Val Arg Phe
 485 490 495
 Ala Met Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Pro Thr His Cys
 500 505 510
 15 Gly Ala Phe Asp Val Thr Phe Met Ala Cys Leu Pro Asn Met Ile Val
 515 520 525
 Met Ala Pro Ser Asp Glu Ala Asp Leu Phe Asn Met Val Ala Thr Ala
 530 535 540
 20 Val Ala Ile Asp Asp Arg Pro Ser Cys Phe Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
 545 550 555 560
 Gly Ile Gly Val Ala Leu Pro Pro Gly Asn Lys Gly Val Pro Ile Glu
 565 570 575
 25 Ile Gly Lys Gly Arg Ile Leu Lys Glu Gly Glu Arg Val Ala Leu Leu
 580 585 590
 Gly Tyr Gly Ser Ala Val Gln Ser Cys Leu Gly Ala Ala Val Met Leu
 595 600 605
 30 Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Cys Lys
 610 615 620
 35 Pro Leu Asp Arg Ala Leu Ile Arg Ser Leu Ala Lys Ser His Glu Val
 625 630 635 640
 Leu Ile Thr Val Glu Glu Gly Ser Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val
 645 650 655
 40 Val Gln Phe Leu Ala Leu Asp Gly Leu Leu Asp Gly Lys Leu Lys Trp
 660 665 670
 Arg Pro Met Val Leu Pro Asp Arg Tyr Ile Asp His Gly Ala Pro Ala
 675 680 685
 45 Asp Gln Leu Ala Glu Ala Gly Leu Met Pro Ser His Ile Ala Ala Thr
 690 695 700
 50 Ala Leu Asn Leu Ile Gly Ala Pro Arg Glu Ala Leu Phe
 705 710 715

Patentansprüche

1. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
2. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder einer mit dieser hybridisierenden DNA-Sequenz codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
3. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz in Pflanzen exprimiert wird.
4. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und eine DNA-Sequenz in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
5. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes *Agrobacterium tumefaciens*, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt.
6. Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll und/oder Carotinoid-Gehalt enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4.

sionskassette gemäß Anspruch 4.

7. Pflanze nach Anspruch 6, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.

8. Verwendung der SEQ ID No. 1 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS.

9. Testsystem basierend auf der Expression einer Expressionskassette gemäß Anspruch 4 zur Identifizierung von Inhibitoren der DOXS. 5

10. Verwendung einer Pflanze enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Herstellung pflanzlicher DOXS.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

Abbildung 1

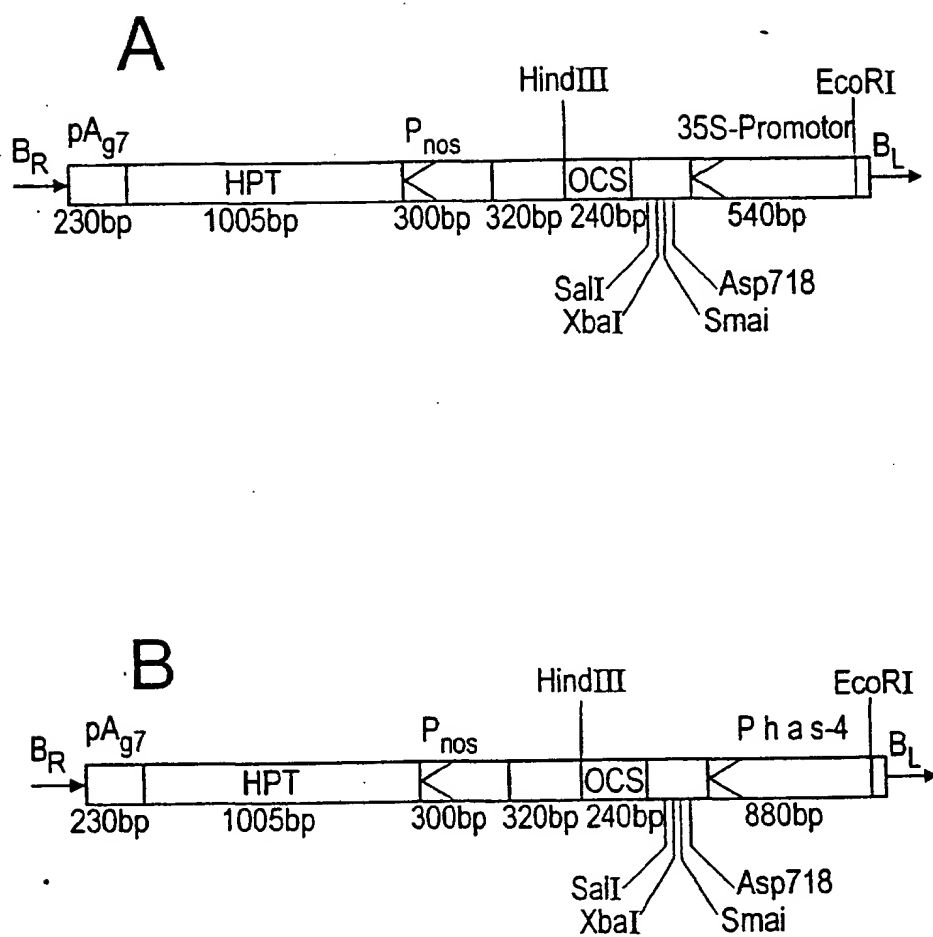


Abbildung 2

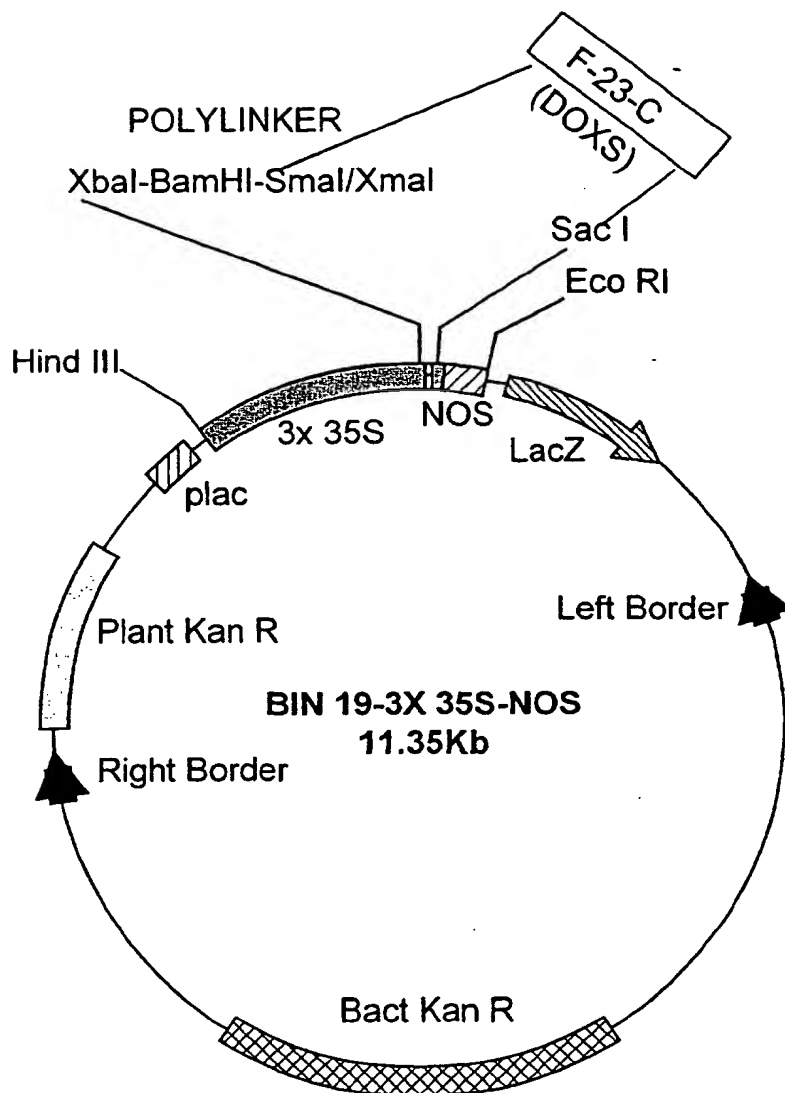


Abbildung 3

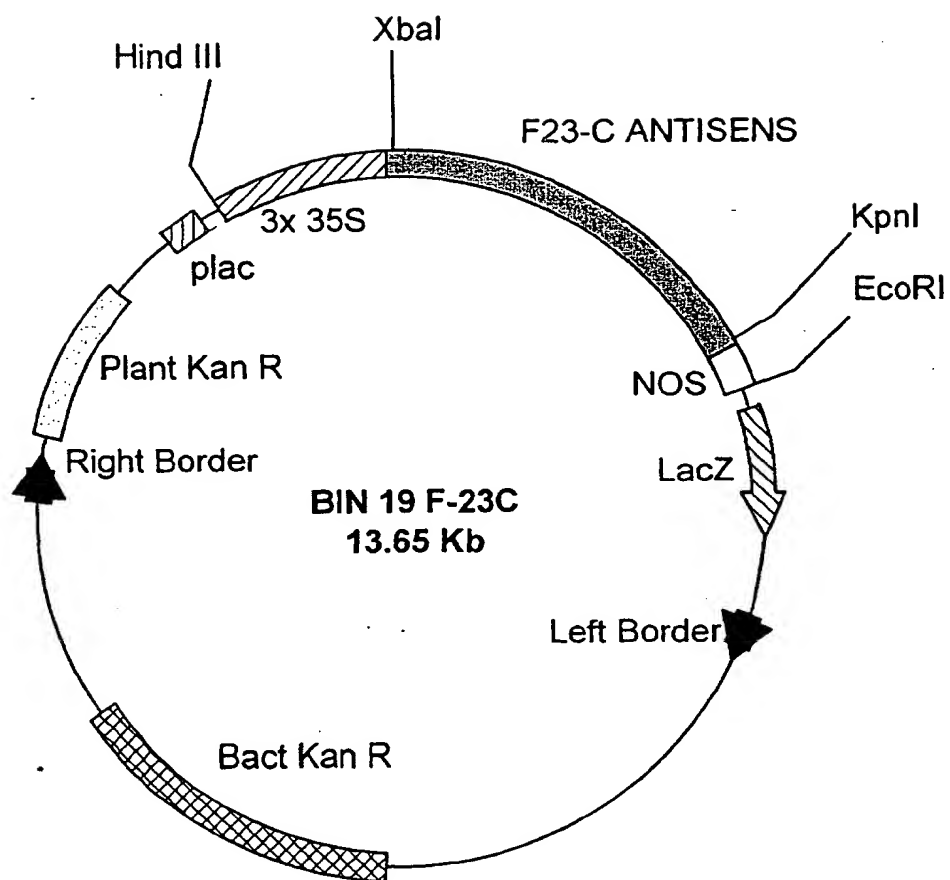


Abb. 4: RNA Expressionslevel des DOXS-Gens

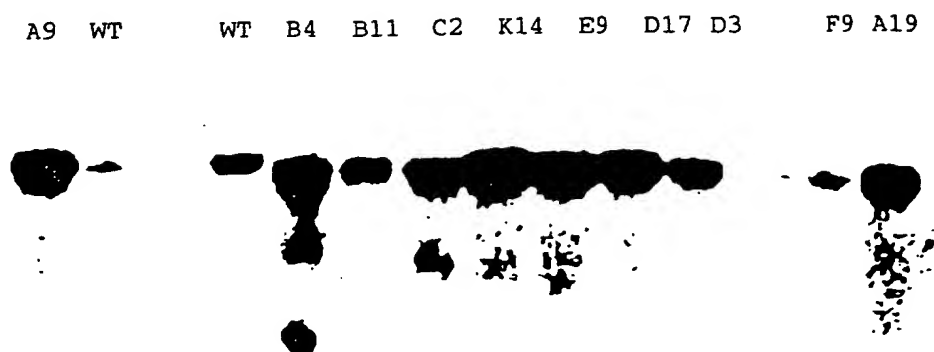


Abb. 5: Protein-Mengen in transgenen Pflanzen

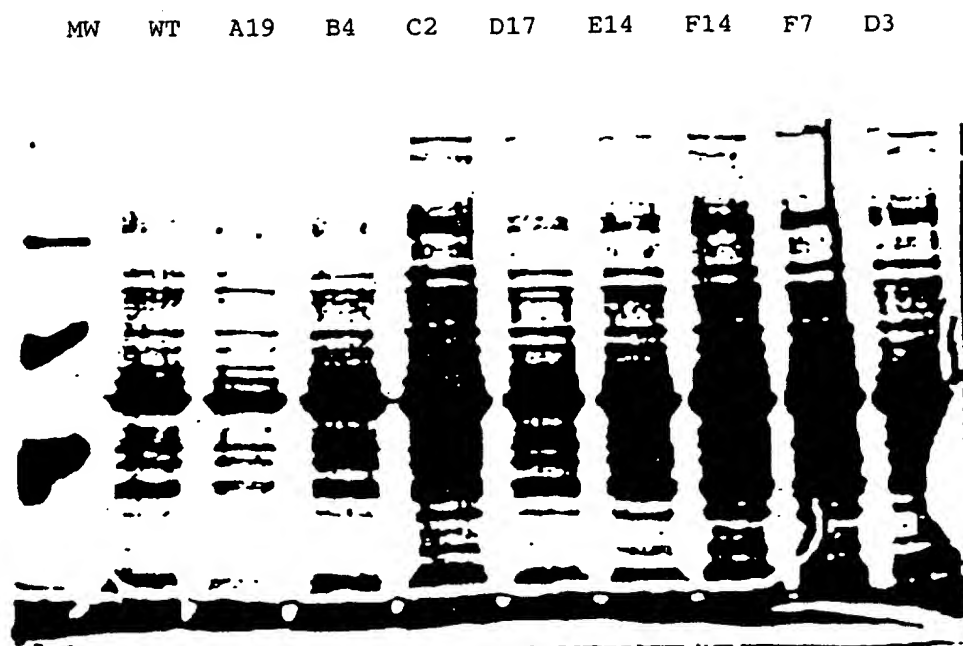


Abb. 6: Westernanalyse

MW WT A19 B4 C2 D17 E14 F14 F7

